

② 公表特許公報 (A)

平1-503275

②公表 平成1年(1989)11月9日

②Int. CL'	殊別記号	序文類似参考	著者請求	先請求
C 12 N 15/00 1/16 C 12 P 21/00		8717-4B K-7421-4B C-6712-4B	予備審査請求 未請求	部門(区分) 1 (1) (全 14 頁)

②発明の名称 酵母ベクター

②特許登録番号 8702334
②出願日 昭63(1988)4月8日②翻訳文提出日 昭63(1988)12月8日
②国際出願番号 PCT/GB88/00276
②国際公開番号 WO88/06027
②国際公開日 昭63(1988)10月20日

優先権主張 ②1987年4月9日②イギリス(GB)登8708495

②発明者 ヒンクリッフ, エドワード イギリス国 ノツテインガムシャー, パートン ジョイル, ラムブ
リイ レーン 16
②出願人 デルタ バイオテクノロジー イギリス国 エヌジー 1 エフディー, ノツテインガム, カース
リミテッド ル ブールバード, カースル コート (番地なし)②代理人 井藤喜 江村 純 外3名
②指定国 A U, B E (広域特許), B R, C H (広域特許), D E (広域特許), D K, F I, F R (広域特
許), G B, G B (広域特許), H U, I T (広域特許), J P, K R, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域
特許)

最終責に謝く

請求の範囲

1. 組換えによって失かされたDNA配列、その1つが同じ方向性を有した他の2つが逆の方向性を有する3個の2 μm PLF組換え部位、及び目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列を含むベクターであつて、上記組換えによって失かされたDNA配列が上記同じ方向性を有する1つとの2つのPLF組換え部位の間にあらる2 μm プラストとドベクター。

2. 増殖マークーDNA配列を含む請求の範囲1の組換えの2 μm プラストとドベクター。

3. (1) ベクタリニア化箇所中のベクターリニアの構成に必要なベクタリニア化部とDNA配列;(2)エキストラ2 μm PLF組換え部位;(3)目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列;及び組換え形態を利用のためマークーDNA配列を備ずる完全2 μm プラストとドベクター、2 μm プラストとの2つの逆方向性配列の1つの組換え部内に組換え部位に上記ベクタリニア化部とDNAが存在し且つ上記エキストラPLF組換え部が組成されており、上記エキストラPLF組換え部は上記逆方向性配列の1つの配列の内壁部PLF組換え部に対しても同じ方向性を有しており、上記ベクタリニア化部とDNA配列はエキストラPLF組換え部と上記逆方向性配列の1つの配列の内壁部PLF組換え部との間にあらる完全2 μm プラストとドベクター。

の範囲2組記載の2 μm プラストとドベクター。

4. 上記組換え部又がニューヨークXba 1 斷片である組次の組合せを3種記載の2 μm プラストとドベクター。

5. 全てのベクタリニア化部が上記のようにエキストラPLF組換え部と内因性組換え部を組合せたもの間にあらる組次の組合せの3種又は4種記載の2 μm プラストとドベクター。

6. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列が群合に対して敏感である請求の範囲1組から5組のいずれか1項記載の2 μm プラストとドベクター。

7. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列、又はHSAをコードするDNA配列であつて、DNA配列はその5末端が酵母D6テロメア配列である組合せを有して組合せの5末端に接する分離リードアンドスクリーニング用の酵母D6テロメアードマーと組合してあり、その5末端が酵母D6末端に接する組合せの5末端の2 μm プラストとドベクター。

8. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列、その5末端がGAL4/OYC1510AL / PGP-HAペイロードドミマーと組合してありその5末端が酵母D6末端に接する組合せの5末端の2 μm プラストとドベクター。

9. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子が、DNA-親分子、あるいは、その変異体が酵母において表現する分離リードー配列を介して酵母において表現する遺伝子プロモーターに組合してそのまま利用する方法が酵母において組合する酵母メタニキシヨンシグナルに組合している *Escherichia coli* の λ -ペルカチーゼをコードする DNA 配列である酵母の酵母第 1 領から酵母 5 領のいずれか 1 領配列の 2 ループラスミドベクター。

10. 作成した第 5 領の pBR322 の配列を酵母第 1 領の酵母の酵母第 1 領配列の 2 ループラスミドベクター。

11. 酵母の酵母第 1 領から酵母 1-5 領のいずれか 1 領配列の 2 ループラスミドベクターの製造法であつて、(i)酵母の酵母第 1 領を用いて DNA 配列を削除するための DNA 配列を削除するための DNA 配列を削除する方法及び(ii)バクタリア内でのベクターの複数を可能にするバクタリアプラスミド DNA と(i)FLP 類似酵母のニレオントを含む導入用 DNA 配列を、ムカシキトフリフ配列と組合してベクター内に作成され且つ直いに他の二重性を有する 2 つの FLP 類似酵母の酵母上位バクタリアプラスミド DNA がはさまれるよう、新規入手 DNA 配列を完全 2 ループラスミドに組み入れることを含む上記の製造法。

12. 上記導入用 DNA 配列を内包性 FLP 類似酵母のニレオント Xba I 領位に導入し、新規入手用 DNA 配列の一

方を末端に 2 ループラスミドの酵母配列の 1 領を有し、一方の末端に 2 ループラスミドの酵母配列の 2 領を有する酵母の酵母第 1 領配列の酵母の酵母第 1 領配列の酵母第 1 領配列。

13. 酵母内に酵母の蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含み、バクタリア DNA は含まれない 2 ループラスミドベクター。

14. 酵母の酵母第 1 領から酵母 1-5 領のいずれか 1 領又は酵母 1-5 領配列の 2 ループラスミドベクターで酵母組合された酵母酵母又は酵母通用酵母。

15. 酵母の酵母第 1-4 領配列の酵母を先導することによつて得られる酵母とする蛋白質又はペプチド。

16. 目的とする蛋白質又はペプチド 1 領位に組合され又は酵母の酵母入されている 2 ループラスミドベクター。

の酵母酵母の酵母酵母を効率よく行なうことができる。

四日新規酵母は一般的に使用されているプラスミドベクターは次の 2 つに大別される。即ち、(i) DNA 多型オリジンを有しているために、クロマソーム DNA と組合することなく自己を複製することができる複数ベクター；及び(iii)クロマソーム DNA と組合えを除く、酵母細胞内の組合性 DNA として複製し自己を複数するインゲンレインベクターの 2 つである。複数ベクターは酵母、酵母の同種 2 ループラスミドから得られる DNA 類似オリジンを含む 2 ループラスミドベクター；酵母細胞のクロマソーム DNA から得られる見掛けの複数オリジンを含む自己複製ベクター；及び上記の DNA 類似オリジンの 1 つを更に 1 ループを含むことによりされている酵母クロマソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEM) に分かれられる。

上記したベクターで有効な酵母を形質転換するためには、複数え DNA を保持する形質転換性を同様して保持することが必要である。この条件は、ベクター DNA 内複数可能又は複数可能とする酵母を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LBN 2, URA3, TRP1 (Mc Gregor et al., 1977; Beagles, 1972; Gerhard et al., 1977) などの原核生物遺伝子が通常使用され、これらは酵母の酵母要求性に加えん欠損を補修するよう作用する。しかしながら、複数用

明 詳 書

図面ベクター

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。

酵母細胞と書かれる工程によつて、複数 DNA が酵母細胞に導込まれ、次いで逐次的に複数されて酵母 DNA の複数が行なわれる。逐次複数についての最初の複数は 1970 年代の後半に行なわれ、その後の複数複数は、酵母の細胞壁を酵素の作用によって剥いてプロトゲストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Hines et al., 1972; Beagles, 1972)。最近ではインシクト酵母細胞を用いた形質転換が認められている (Beagles et al., 1973)。

酵母は複数カプラスミドを用いて形質転換することができる、この目的のため形質転換、“シケルベクター”として複数されたプラスミドが使用されており、このシケルベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても複数することができる (Hines et al., 1972; Beagles, 1972; Sirbules et al., 1972)。

pBR322 (Bolivar, 1978) などの *E. coli* プラスミド DNA 配列が *E. coli* 中に収容されることによつて、*E. coli* 中でのベクター DNA の量が増加され、そ

原因及び他の工業用途に用いられる酵母はしばしば酵母体にあらためて供給されるが、既に述べたように酵母細胞に蓄積された過剰酵素を利用することが必要である。この点で開発して、過剰の酵素を発現する過剰子を供給した 2 μm 由来複製マスクミドベクターが報告されている。即ち、M 6 2 1 B (Jainos et al., 1976; Webster et al., 1983)、ハイブロッキン B (Oriz et al., 1983)、クロラムフェニコール (Cesca et al., 1980; Hodfield et al., 1986) などの抗生物質に対して、及び硫酸基團カルボン酸ミクロンゲル (Fazio et al., 1985)、コンバタシン (Kao et al., 1983)、等 (Hodfield et al., 1985) などの他の微生物に対してして過剰子を発現する過剰子を用いた例がある。

導出中で過剰子導出子が既定に発現されるか否かかけ、形質転換用いた酵母ベクターのタイプに依存している。前記した 2 つのタイプのベクターのうちで過剰子ベクターはインテグレートベクターである。酵母のインテグレート形質転換の原理及び実験については文献 (Batziger & Davis, 1982; Winetos et al., 1983; Orr & Wever et al., 1985; Webster, 1983) に記載されている。一般にインテグレート形質転換は比較的その効率が低く、開発状況インテグレートベクタードの場合には DNA 1 番当たり約 1~10 個の形質転換子が得られることが報告されている。

マスクミド細胞を個々に 2 番コピーの割合いで有致し (Clark & Carter, 1980)、1 世代当たりわずかに 1 % が失なわれるにすぎない (Webster et al., 1983)。マスクミド由来マスクミドは、有効の供給が複数マスクミドの導入によって得られる 2 μm DNA 配列を取つて有効の過剰的供給性を示す。

2 μm マスクミドは酵母の被用がなしていることが知られている (Holzen & Padgett, 1977; Livingston & Hevesi, 1977; Bailey et al., 1980; Takei et al., 1980; Sigerdson et al., 1981) が、メンタルの方法よりも遺伝されない (Livingston, 1977)。2 μm マスクミドを持たない細胞 (ER) が、細胞当たり 2 μm マスクミドの平均コピー数が 5.0 である半数体酵母集団から 1 世代後で 0.01~0.01~0.01 の割合いで消失することが示されている (Fletcher & Cox, 1983)。このような低レベルの遺伝的不安定性の原因を説明するものとして、2 μm マスクミドは通常の成長条件下で細胞に対して向むらの対応を有していないことが考えられる (Broach, 1981; Fletcher & Cox, 1983; Sigerdson et al., 1981)。しかしながら、2 μm マスクミドを有している株について 2 μm マスクミドが成長速度に対してわずかがら効果を及ぼしていることが報告されている (Webster et al., 1983)。S. cerevisiae の他の株を参照した所、複数用酵母

（Macon et al., 1979; Sticks et al., 1979）をしかしながら、酵母クロモソーム DNA と同様性を有するリバーナードを持つ複数 DNA は高い効率（1.00~1.000 倍）で導出を有効化し、複数細胞に用いた例は一般に酵母細胞に対して有効性を有する酵母中に組込まれる (Orr & Wever et al., 1982)。従つて、過剰子導出子を用いてベクター DNA を組換することによつて、形質転換の効率を高めることが可能である。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソームのインテグレート部位を定めることができるのである。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソーム内に組込まれるマスクミド DNA 記憶が、複数細胞の複数細胞の導出子内に組込まれる例は、先用用酵母の過剰子のモティフィケーションのインテグレート形質転換を用いることができる。最近、先用用酵母に用いるインテグレート酵母ベクターについて報告されている (Yooch, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに選択的増殖に変更が出来られるが、複数ベクターはこれとは相反して不安定である。選択的増殖を受ける選択圧は用いる複数ベクターのタイプに依る。AAB プラスミドは高モロジー度で存在し（細胞 1 個当たり約 2.0~3.0 ポリマー）、より安定した傾向にあるが、1 世代当たり約 1.0 % 以上の頻度で失なわれる (Kao et al., 1983)。しかしながら、AAB プラスミドの欠陥性はセントロメアが組合することによって上昇する。セントロメア

（Taub, 1980; Aigle et al., 1980; Hinckleiff & Daubney, 1986）などの酵母のはほとんどが常に 2 μm プラスミドが存在していきことが報告されている (Clark-Walker & McKlos, 1974)。従つて、2 μm プラスミドは常に存在しており、このことが本質的に選択的増殖性を有していることを示していると考えられている。

2 μm プラスミドについての遺伝子分析及び分子分析の結果、2 μm プラスミドの複数及び安定性に関しても多くの論議がなされている (Volpert & Brotch, 1987)。本質的にはこのプラスミドは 6~15 個種々の複数 DNA 分子から成り立っている (Hartley & Dosalson, 1980)。そしてこのプラスミドは二つの二方向性の DNA 複製カーリングを有しており (Hewitt et al., 1981)、これがすべての 2 μm 由来ベクターの必須要件とされている。2 μm プラスミドは 5 つの複数子、B 1 つ XEP 1, XEP 2, XEP 3 及び FLP を含んでおり、これらが細胞 1 個当たりのコピー数を高く実効に増殖するためには必要とされている。

XEP 1 と XEP 2 過剰子はトランス作蛋白質由来をコードしており、この蛋白質は、XEP 3 複合子原と相互に作用して活力として機能を発揮し、複数子群の間に 2 μm プラスミドの分割が安定に行なわれるのを可能とらしめていると考へられている (Volpert & Broach, 1987)。この点に要して、XEP 3 過剰子は、2 μm プラスミド

の安定本分野を行なうレバーベンソン氏として作用しており、タムシマー・シントンアンドラムの実業家を有している (Jeyaraj et al., 1980; Kuroki, 1985)。2 mPテヌイドの重複性は物語は、2つの逆方向反復DNA配列 (それぞれ5'5'端対) が存在することであり、この配置によって複数分子が2つのヘリック領域に分離されている。逆方向反復DNA配列の間で分子内組換えが起こり、一方のヘリック領域が他のヘリック領域に対して逆方向となり、A及びBと書かれるプラスミドの複数性が生じて *in vivo* で2つの異性体を有する複数分子が産生される (Boeger, 1978)。2つの逆方向反復DNA配列の間で組換えには、PLPと書かれる複数子の蛋白質由来によって仲介され、PLP蛋白質が逆方向反復領域内での複数度の組換えを仲介することができる。この組換えの機序によつて、プラスミド二重の構造が複数されていると考えられている (Foster, 1986; Vozzella & Breath, 1986; Son et al., 1986; Murray et al., 1987)。

それだけの逆方向反復配列は、2つのDNA反復配列サブユニット (重複性は三角形である) を含んでおり、そのうちの2つのサブユニットはお互いに同じ方向性を有しており、他の1つのサブユニットは逆方向であつて2種類の結合部はペーパーー接着法を介して他の2つのサブユニットのうちの1つに結合し

これらのペクターは、内因性のデタミドのREF 1及びREF 2組換えによってコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いるが必修があるためである。異性複数子を発現して同時に重複性を保つペクターを画素レベルで選択することのできる選択的性は修正されると複数子を構成する場合には、通常、ヨコロービー数の複数ペクターを選択することが望ましい。2 mP由来ペクターは表現プラスミドとして用いるには多大の好適であることが証明されており、今日ではしばしば2 mP由来ペクターが用いられている (Engelman et al., 1985)。

既発表的は複数子S-63-503039、1 (公報番号0-2012539) は、当該デタミド・ダイオキタノリジン-Lys (D) は、最初のビーロー反復領域には真複数子の先端が抱きこらす、複数の重複が寄附されるその後ビーローから複数子を取り出すと異性蛋白質の合成が誘導されるように、工業用酵母株を複数子的に修正して既発用酵母株中で異性蛋白質を産生する方法が記載されている。かかる方法は、活力を遮断マークー-DUP-1と修正とトキソ蛋白質白質ドーメンチャカルアルブミン (M61-HBA) をコードする複数子とを有する2つの由来ペクターであつて既発用酵母の発酵がガラクタースペクターによって酵素レベルで誘導されているペクターで、発酵用酵母を形質転換することによって選択される。上記の方法の実施範囲中に、真複数蛋白質の合成量を

している。このスペーサー領域はニューヨークKoz 1部位を有しており、PLP連鎖子の生産能を遮断せしめてその生産能によってその実験が切離される。それに隣接している配列は、他の逆方向反復配列に対応する配列に對して相容性を有してあり、逆つて末端が切離された後に逆方向組換えが行なわれる。Andreaらによつて、S-2p、スペーサー領域を含む74位基团の配列がPLP移位導導的組換えには最低限必要であることが見出され (Andrea et al., 1985)。

2 mPテヌイドの複数子に導入した他のペクターには、2 mPプラスミドの復興に必須ではない領域を異性DNA配列を導入することによって選択される (Dress, 1981)。このようないベクターには基本方に2つのタイプがある。即ち、川井2 mPベクター及びN-2 mPベクターである。前者の場合は、2 mPベクターの全てを有してあり、そこでC-2011プラスミドDNAなどの各種の共性配列が導入されている。このようない導入されたプラスミドは、C-17 (2 mP全質) 及びC-18 (2 mP欠損) 由来のいずれかにても、高い表現的活性性を有しており高いコピー数で選択される。後者後者の2 mPオリジンベクターは、通常、2 mPのDNA複数オリジンと2 mPのS-99逆方向反復配列のシングルロードを有する最少DNA配列を持つのみであつて、このようないベクターはC-17等と競争せしか難特できない。何故なら、安定期に組換えされるためには、

最初にすこちために次のことを実現するのが必要である。即ち、川井発現される複数子 (M61-HBAをヨードする) の高ロード数 (川井発現性を生産条件下において目的とする複数子の選択的活性性が高いこと) と既発用酵母に導入される組換え複数子は、酵母及び既発用酵母ペクター及び真複数蛋白質の発生能に必要な効率を有えねばことと、及び川井発現性に有効な組換え複数子は、出来得る限り、目的する複数子及びそれに隣接する組換え複数子に組むべきであるなど、である。上記例は特に直感的であり、通常の既発用酵母の育成メソッド、即ちデオノゲンが添加された要素培養液中に硝イオンなどの無機物質を添加することは望ましくないが実用的でない。硝イオンを移動する場合には、工程リスト上が上記、第1の実験無用物であるオールの質に有害で作用し得る有効性を有えことになる。上記例に従しては、既発子の純度が既正された酵母は、組換えプラスミドのペクテリア由來の配列部分に相当する配列などの企みなDNA配列を有しているのが望ましい。

本実験例の実験はあつてEPI-A-2-51744として公報された新規酵母には、目的するDNA配列を有する組換え2 mPプラスミドDNA配列の2つのロード方向に方向性を有しているインシゲートペクターを構成し、このペクターで酵母を形質転換し、次いで得られる形質転換酵母から、目的とするDNA配列が既正されて既正された内因性2 mPプラスミドを獲得する

胚乳を無効することによって、内胚乳2 mmプラスミド目的とする胚乳葉又はペクタリニアロードするDNA配列を導入して、胚乳細胞を導致する方法が記載されている。インテグレートペクタリニア葉又は胚乳細胞培養培養中で存在できき。宿主細胞2 mmプラスミドDNA配列は、通常はそうではないが、2 mmプラスミド胚乳細胞のコピーであつてもよい。

本発明者は、修正されれた2 mmプラスミドを導入することによって胚乳細胞を胚乳細胞することのできる、上記細胞を配列された方法の実験を見出した。

本発明の方法では、使用するプラスミドペクタリニアは、2つの同じ方向性を有している相対性2 mmプラスミドDNA PLF組換配列の間に導入されているペクタリニア中のペクタリニアの増殖を可能にするDNA配列、目的とする胚乳葉又はペクタリニアをコードするDNA配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは胚乳に内して増殖のDNA配列、及び好ましくは温湯マーカーDNA配列も含むペクタリニアである。本発明の2 mmプラスミドペクタリニアは、PLF組換部位のまのコピーを有しておき、その1側は同じ方向性を有しており、他の2側は逆の方向性を有している。このような構造を有するペクタリニア中のペクタリニアの増殖を可能にするDNA配列は自然に失われ、プラスミドペクタリニアは、形質転換微生物の内胚乳2 mmプラスミドを導入する胚乳2 mmプラスミド

本発明の2 mmプラスミドインテグレートペクタリニアは、実験室及び工業用のいずれの研究も形質転換できることが見出された。このペクタリニアは、細胞1個当たり1個の増殖コピー数で相対性2 mm葉に高い遺伝的安定性を有している。更に、これまで報告されている他の2 mmプラスミドと異なつて、本発明のインテグレートペクタリニア中のペクタリニアは、細胞が形質転換される際に、ペクタリニアプラスミドDNA配列が自然に除去されるよう代謝されている。かくして、2 mmプラスミドに導入された目的とする遺伝子又は、非選択的遺伝子条件においても部分性ペクタリニアプラスミドDNA配列が除去されることなく細胞1個のコピー数が高い状態で維持される先導用酵母の遺伝子の質正確が維持できる。このようなペクタリニアを用いて遺伝子的に修正された先導用酵母を操作することにより、目的とする遺伝子のみが先導用酵母の他の世代まで安定化能がされ、これによつて、付加的とDNA配列が酵母の運動及び/又は酵母によって産生されるペールの量を並びに増加化が可能である。

実際には、目的とする遺伝子はいかれの条件も遺伝子をもつてもよく、また研究対象は各種のものでも同様のものでもよい。本発明のインテグレートペクタリニアは例えば、先導用酵母にMol-1 H4遺伝子を安定化インテグレートするのに用いことができる。この遺伝子は、例えばE. coli K-12 4719号明細

となる。この種のプラスミドペクタリニアを以てゲノムインテグレートペクタリニアとい。このようなペクタリニアで形質転換された酵母は、目的とする遺伝子を含みペクタリニアは含まれない胚乳2 mmプラスミドの多量の白色酵母コピーを有しており、これらは非選択的生産酵母下において遺伝子が安定化されることが見出されている。

1989年秋の第15回目の「微生物学会及び分子生物学会」についてカウンフェレンスで、Bruschiは、2 mmプラスミドの組換えによつてペクタリニアDNA配列が組換されることを報告したが、それは、その系でDNA分子の構造と構造との関係を研究するのに用いることができることを示唆したすぎない。本発明者らは、同様の系が、予期せぬ安定性を有する有効な操作ペクタリニアの構造に用いることができるを見出した。

本発明で用いる「PLF組換え技術」とは、PLF組換え技術との相互作用の結果、組換えが可能な部位のいずれかを示す。もしActionらの発見(1989)が正しいならば、PLF組換え部位は、通常は2つ以上で固定された4 bp配列をその差を示すとして示している。実際には、完全復元何より？？組換え以上を示していたとしても何んらの意味もない。

特に記載された方法に従つてカルボゲリセレートセラーゼペクタリニア(POK)により、あるいは別名はEP-1-2-2-9号明細書に記載されたOKL10/CYC1ペクタリニアを用い、あるいはE. coli K-12 508607号明細書に記載されたOKL/POKペクタリニアなどの他の酵母ペクタリニアによつて表現される。

本発明の系によつて安定化操作される付加的な遺伝子は、例えば、先導用酵母で心臓脂質グロブリンペクタリニアの遺伝子を導入するSaccharomyces cerevisiaeのDEX1遺伝子、先導用酵母でのエンド-1、2-1、3-4-ペクタリニア等の遺伝子を導入するBacillus subtilisのペクタリニア等の遺伝子、*Hansenula* & *Box*、1-9-5などである。このような遺伝子は、遺伝子の先導用ペクタリニア及び/又は遺伝子によって産生される蛋白質が先導用酵母から分別されるようだ、最初の遺伝子のために修正することができる。

本発明の新しいインテグレートペクタリニアは、E. coli K-12 2-2-3-9号明細書に記載された工具用工具のものを用いる。なぜなら、この工具によれば、目的とする遺伝子はペクタリニアの構造は発現されずまた酵母の遺伝子の生育条件下でも発現されず、育成法の工程で操作されるようになるとされている。従つて、目的とする遺伝子の高レベル表現の

西脇と、特許権者によって陳述のバイオマーが本発明を
れる使用とが分離されており、これによって、アラス
ミド産業性は既述の遺伝子型の基準を最も少にす
ることができる。

本発明のバイオマーは、(1)バクテリア細胞中の当該
バイオマーの増殖性基質をバクテリアプラスミドDNA配列；(2)エキストラ2ムFLP組換え部位；(3)目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列；及び(4)
蛋白質産業性供給用の選択マークーDNA配列を有する元
生2ムプラスミドを含むディスインテグレインペプチド
バイオマー(前記記載の通り)であつて、2ムプラス
ミドの2つの反方向反復配列の1つをヨードー内の例
えばXba I部位に挿入されている。DNA反復配列の区
しい方は、プラスミドの基準に従つてある。例えば
E. coliでの増殖に必要となるバクテリアプラスミド配列
は、2ムプラスミドのFLP組換え部位の同じ反方向性
を有する2つのコピーの間には含まれるようによりプラス
ミドが構成される。DNA配列の配置は、第3回に説
く説明されている。このように使用することによって、
プラスミドを選択基準として挿入した時に2つの同じ反方向性を
有するDNA反復配列の間に生じる部位特異的組換えに
よりプラスミドから抜かれてしまうDNAの領域内に、
バクテリアプラスミドDNA配列を配置するとができる
。この部位特異的組換えは、2ムプラスミドの
FLP組換え部位によって仲介され、この部位は、
citr B組換え部位が組み込まれた内因性2ムア
プラスミドによって構成され、citr B組換え部位が組み込まれ
た場合だけはディスインテグレインペプチド生産
によって供給される。本発明のバイオマーは、形態選択
する内因性2ムプラスミドを特徴とする供給用アラス
ミドが存在するFLP組換え部位のユキサミココピーとが

ことから、本発明のバイオマーは完全2ムプラスミド
に吉澤のものが得やすい。しかしながら、本発明のバイ
オマーが内因性2ムプラスミドと共に存在する場合には
は、無ペプチド化しないTBP 1, TBP 2, TBP 3,
FLPなどの選択子は、これら選択子の生産によってもと
リシンドウ作用蛋白質として供給される。これらの中すべて
は供給のオリジンが必要なものである。

以下に説明するように、バクテリアDNA配列を有する
挿入用DNA配列は、そのそれぞれの末端と反復配列
のそれぞれの部分を保持しててもよい、この場合に
は挿入用DNA配列は、内因性組換え部位が構成され
て初めて2つの新しいFLP組換え部位が構成されるよ
うに内因性反復配列内に挿入され、このFLP組換え部
位はそれぞれ内因性組換え部位と挿入された挿入用
DNAの組換え部分とからなっている。あるいはまた、
完全なFLP組換え部位を挿入用DNA配列の一端に挿入
し、反対側に持たれるFLP組換え部位、バクテリアDNA配列
が内因性反復配列と挿入用反復配列との間に存在するよ
うに、内因性反復配列に接続して又は離れて挿入され
る。挿入用DNA配列が、内因性反復配列から離れて
位置に挿入される場合には、内因性反復配列と挿入さ
れた反復配列との間の内因性DNA配列はバクテリ
アDNA配列とともに除外される。従つてこのDNA配列
が必要な場合には、挿入用反復配列の内因性反復配列
から離れた側にくわしく挿入されるDNA配列上に

挿入された完全2ムプラスミドからなる。更には、
選択子を挿入する選択マークー例えばCOP-3-1と共に
常に挿入された目的とする遺伝子が、2ムプラスミ
ドの第2の部位に挿入されている。バクテリアプラス
ミドDNA配列と選択DNA反復配列とが、全く2ムプラ
スミドの2つの反方向反復配列の1つヨードー内の例
えばXba I部位に挿入されている。DNA反復配列の区
しい方は、プラスミドの基準に従つてある。例えば
E. coliでの増殖に必要となるバクテリアプラスミド配列
は、2ムプラスミドのFLP組換え部位の同じ反方向性
を有する2つのコピーの間には含まれるようによりプラス
ミドが構成される。DNA配列の配置は、第3回に説
く説明されている。このように使用することによって、
プラスミドを選択基準として挿入した時に2つの同じ反方向性を
有するDNA反復配列の間に生じる部位特異的組換えに
よりプラスミドから抜かれてしまうDNAの領域内に、
バクテリアプラスミドDNA配列を配置するとができる
。この部位特異的組換えは、2ムプラスミドの
FLP組換え部位によって仲介され、この部位は、
citr B組換え部位が組み込まれた内因性2ムア
プラスミドによって構成され、citr B組換え部位が組み込まれ
た場合だけはディスインテグレインペプチド生産
によって供給される。本発明のバイオマーは、形態選択
する内因性2ムプラスミドを特徴とする供給用アラス
ミドが存在するFLP組換え部位のユキサミココピーとが

同じDNA配列の1つのコピーを置く必要がある。
目的とする選択子を挿入するインテグラル2ムア
プラスミドの部位は、挿入によってプラスミドヨードー部
及び選択的反復性への効率が最もよいとされる部位であ
る。従つて、TBP 1, TBP 2, TBP 3及びFLP組換
子に対して最も多くなる部位に目的とする選
択子を挿入する方が最もよく、特に、プラスミドを選
択するcitr B組換え部位が組み込まれた場合にそのよう
にするのが最もよい。

本発明のディスインテグレインペプチドバイオマーの1つ
の特徴を挙げると、それをcitr B組換え部位に挿入した場合
はそれをインテグラル2ムアラスミドを有して
いるためバクテリアプラスミド配列が組み込まれる場
合には挿入された部位にそれが内因性2ムアラスミド
を構成することができる。同様の状態について
は、挿入のcitr B組換え部位に挿入された完全な2ムペプチド
がCitr B組換え部位をもつていて Hartford and Peeters,
1986)。本発明のディスインテグレインペプチドバイオマー
は、選択子の内因性2ムアラスミドを構成するた
めに用いるものである。

説明した如きにおいては挿入のことが示されている。
既述1段は、プラスミドpBA 112 (Adams, et al.,
1985)を示す。細い縦は、バクテリアアラスミド
pUC 9から選択されるDNA配列を示し、太い縦の間
には、FLP組換え部位をもつ2ム塩野西DNAプラスミド

ントを示し、正負部は、それぞれのPLF産業部位内
のうちの内部DNA反復配列の方舟を示す(Aszkenasy,
et al., 1,9,8,5)。

第2回は、プラスミドpBAC 1 1 2を示す。プラス
ミドpBAC 1 1 2は、Bac 3 1, Bac 1 及び Xba I 部
位が削除されている以外は pBAC 1 1 2と同じである。

第3回は、プラスミドpBAC 3を示す。大い筋は、
バクテリアプラスミドpUC 9のDNA配列を示し、大い
な差の点は、PLF産業部位を含む74箇所のDNA
アシグメントを示し、細い筋は 2.4 kb プラスミドDNA
配列を示し、正負部は、それぞれのPLF産業部位内
のうちの内部DNA反復配列の方舟を示す。

第4回は、プラスミドpBAC 3 U 1を示し、記号は第
3回と同じである。

第5回は、pBAC 3 0のプラスミドマップを示し、
記号は第3回と同じである。

第6回は、pBAC 3 0 0のプラスミドマップを示し、
記号は第3回と同じである。

第7回は、pBAC 3 1 0のプラスミドマップを示し、
記号は第3回と同じである。

第8回は、pBAC 3 0 1のプラスミドマップを示し、
記号は第3回と同じである。

第9回は、細胞生物学的性質を示す本質に囲まれた
説明であり、DNA 3 0及びバクテリア bla 遺伝子の遺傳
的変異性を示す。

図1で開示したpBAC 1 1 2を運転した。運転して
得られるDNAを E. coli K-12 (NSL Enzymes Ltd.,
Cambridge, England) から入手した)に導入した。
得られたアンピシリン耐性の形質変換株について、プラ
スミドpDB 9.2 (Storts, Kix, et al., 1,9,7,9)から得たラバ化2.2 kb DNAを Eco R I フラグ
メントとのコロニー-ハイブリダイゼーションにより
(Grunstein and Roggess, 1,9,7,5)、2 kb プラスミ
ドに対する相補性をクリーニングした。2 kb プラ
スミドに導入したDNAがPLFアシグメントを示す
コロニーを単離し、そのプラスミドDNAを別個のラバ
化2.2 kb DNAでハイブリダイゼーションにより
得られた。

プラスミドpBAC 3を細胞生物学的性質pET 1で開示するこ
とによって、プラスミドpBAC 3 U 1 (第4回)及び
pBAC 3 U 2 (第5回)を構築した。細胞DNAを、
0.3 mM dNTP (GATP, GTP, dCTP 及び dGTP) の存在
下で 57 ℃ で 10 分間、T₄ DNAポリメラーゼで熱
処してプラント処理とした。DNAをエチノール: クロ
ロホルムで抽出し、リゲーションを行なう細胞エタノ
ール洗浄を行なった。プラスミドpDB 1 1 0 (Rogers,
1,9,8,1)を、前説細胞K-12で運転し、DNAアシ
グメントを 1.0 mg/ml のアガロースゲル電気泳動に通し
た。母母のURAの遺伝子を有する 2.4 kb 削除部DNA
フラグメントをゲルから単離し (Maniatis, et al.,

第1回は、DNAでテカル化したpBAC 3 DNAをウ
ロープした全細胞DNAのコードジオグラフィーを示
す。

以下に、本発明を実用例により説明する。

実用例1

プラスミドの構成

プラスミドpBAC 1 1 2 (第1回, Aszkenasy, et al.,
1,9,8,5)を、制限酵素 Bam H I 及び Hind III で同時に
消化することによってプラスミド pBAC 1 1 2 (第2
回)を構築した。細胞プラスミドDNAを、0.3 mM
dNTP (GATP, GTP, dCTP, 及び dGTP) の存在下
で 7 ℃ で 10 分間、DNAポリメラーゼ I (ターレー)
で処理した。DNAをエチノール: クロロホルムで抽出
し、エタノール洗浄し、久いてDNAリガーゼを添加
して 1.5 ℃ で 1 時間インキュベートした。運転された
DNAを E. coli K-12 1 0 6 1 (Cesabahan and Cohen,
1,9,8,5) IC導入し、得られる細胞生物学的性質からアグ
リスミドpBAC 1 1 2を単離し、Birnboim and Doly (1980)
の方法によって細胞質DNAを用行なった。

以下のようにしてプラスミドpBAC 3 (あるいは)
を構築した。Gutierrez, et al., (1,9,7,4)に記載
された方法と同様にして T4 1 件から、原種 2 kb プラ
スミドDNAを単離した。複製した 2 kb プラスミド
DNAを、Maniatis, et al., (1,9,8,2)に記載された
方法と同様にして、制限酵素 Xba I で部分消化し、

1,9,8,2)、0.3 mM dNTP (GATP, GTP, dCTP 及
び dGTP) の存在下で DNAポリメラーゼ I (ターレー)
で処理した。1.1 kb 削除部 Hind III フラグメントを
エチノール: クロロホルムで抽出し、エタノールを除
け付し、上記で複製した細胞 pBAC 3 DNAとアグリ
ント東洋で運転した。得られる運転DNAを E. coli K-12
に導入した。得られるアグリシリン耐性形質変換株について、
プラスミドpDB 1 1 0 から複製される 1.1
kb 削除部 Hind III フラグメントの 2.0 kb ベルトを用
いたコロニー-ハイブリダイゼーションにより
(Grunstein and Roggess, 1,9,7,5)、URA 3 遺伝子
に対する相補性をスクリーニングした。URA 3 遺伝子
プローブに外して相補性を示すコロニーから、プラス
ミドpBAC 3 U 1 (第4回) 及び pBAC 3 U 2 (第5回)
を単離した。また、URA 3 遺伝子を含む 1.1 kb 削除
部 Hind III DNA フラグメントを、pBAC 3 のニード
Bac 1 削除及び Xba I 1 BP 位点ハイブリダイゼーションで運転し
て、pBAC 3 U 0 (第6回) 及び pBAC 3 U 1 (第7回)
と命名されたプラスミドをそれぞれ得た。

プラスミドpET 1 3 : 1 (Hooderson, et al.,
1,9,8,5) から得られる CUP 1 遺伝子を保持する 694
bp 遺伝子 Xba I - Xba I DNA プラグメントを、pBAC 3
のユニーク pET 1 部位へアシグメント実験で運転するこ
とによって、プラスミドpBAC 3 U 1 (第8回) を構築
した。

アラミド-pSAC 5 U 1 及び pSAC 5 U 2 の各酵母形質転換法。

ダイスキンテグレシジョンベクター pSAC 5 U 1 (第 4 図) 及び pSAC 5 U 2 (第 5 図) は、2 種のフォームのユーロー *Pat 1* 白斑に挿入された酵母選進子 URA3 をそれぞれ含むように構成されている。更にはそれぞれのプラスミドは、同じ方向性を有する PFL 遺伝子部位の 2 つのローターに接している。ベクタリニアラミド-pUC 9 から得られる DNA 断片を保持している。pUC 9 DNA の位置は、これらの方方向性を有する 2 つの PFL 遺伝子部位の間での PFL を介しての組合せが組みこり、その結果、断片の新規酵母の断片ベクタリニアラミド-pUC 9 DNA が断片化されるよう位置である。250 (1.9×8) の方法に従って、プラスミド pSAC 5 U 1 及び pSAC 5 U 2 で、半数体酵母を 1.5% - 2.0% *cit* 及び *cit** 選進子を *Escherichia coli* (Sambrook, et al., 1989) を形質転換してウラシル耐性菌とした。得られた URA3 形質転換体について、Chevalier と Angle (1979) の方法により、酵母でローラクタム供給の酵母細胞・ケタマーベニシード等のバクテリア bla 選進子の遺傳的構造をスクリーニングした。第 9 図にその結果が示されており、それによれば、兩者のプラスミドは、全ての *cit** の形質転換体において URA3 選進子から bla 選進子を分離 (segregate) しており、酵母の形質転換の際に、プラスミドからベクタリニアラミド DNA 断片が

除去されたことを示している。しかしながら、*cit** 体の pSAC 5 U 1 形質転換体の大部分については、bla 選進子が遺伝的構造化されていることが示唆された (pSAC 5 U 1 については 20 のうち 15 突、pSAC 5 U 2 については 20 のうち 18 突)。これららのデータから、プラスミドの構造、即ち PFL によるバクタリニアラミド-pDNA 配列の位置は、*cit** 体よりも *cit* 体の形質転換の際により多く発生することが示唆されている。

形質転換の分子分析

bla 選進子を含むした URA3 形質転換体 (即ち、*cit** ラクタマーゼ・オダタイプ・クローン、*cit* 体) 及び、実際に bla 選進子とそれに隣接したバクタリニアラミド-pDNA 配列を失なっているか否かを調べるために、酵母 DNA を分析した。pSAC 5 U 1 又は pSAC 5 U 2 で形質転換された *cit* 及び *cit** 体の 2 つの URA3 DNA 形質転換体、*lacZ* と全くない酵母を各培地で生育せしめて、板上に示す方法でその DNA を抽出した。よく発達した細胞を採取し、それらを、1 M ソルビトール、0.025 M エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) pH 8.0、8 N NaOH ジオキソスレート (0.5 ml) に 28 ℃ で 1.5 分間再溶解した。次いで、溶液を採取し、1.2 M ソルビトール、0.1 M ケニン酸ナトリウム、0.01 M EDTA pH 5.8、0.025 M Na サイザリナーゼ (キリンゴール、No. 144) のうち 2.8 ml で、グロトグラムが得られるまで透析液した。得られるグロトブ

クエットを、1.2 N ソルビトールで回収後し、3 M ケルコンセル、0.3 M リトリス / HCl pH 7.5、0.2 M EDTA、1.0 M NaOH プロテイニアーゼ K の 1/40 及び 5.5% で 60 分間再溶解した。クロロホルム : イソプロピノール、エチノール、クロロホルム : 次いでユーチュウ DNA 構成部を抽出し、1.0 M NaCl / NaAc、1 M EDTA pH 8.0 に対して透析した。酵母全 DNA を、無酵母酵母 Escherichia coli、Xba 1 及び *Pat 1* で処理し、得られた DNA フラグメントをアガロース電気泳動で分離した。アゲンションシステム (Maniatis, et al., 1982) に従い、酵母全 DNA を ³²P ラベル化 pSAC 5 DNA とハイブリダイズさせた。その後は第 10 図に示されており、第 10 図は、³²P ラベル化 pSAC 5 DNA をブロードされた酵母全 DNA オートラジオグラフィーを示している。プラスミド pSAC 5 U 1 及び pSAC 5 U 2 で形質転換された *cit* 1.5% - 2.0% *cit** 体から DNA を抽出した。それぞれの純 / プラスミドの結合させた 2 つの形質転換体を *cit* 及び *cit** で分離した。DNA は次のように粗画素度で消化した。

Pat 1 : トランク 1 - 4 及び 21 - 24
Pat 1 : トランク 5 - 12
Pat 1 : トランク 13 - 20。

トランク	プラスミド	<i>cit</i> * / <i>cit</i>	導入 (A/B)
6, 14, 22	pSAC 5 U 1	<i>cit</i> *	A
8, 16, 24	pSAC 5 U 1	<i>cit</i> *	B
5, 15, 21	pSAC 5 U 1	<i>cit</i> *	A
7, 15, 25	pSAC 5 U 1	<i>cit</i> *	B
2, 10, 18	pSAC 5 U 2	<i>cit</i> *	A
4, 12, 20	pSAC 5 U 2	<i>cit</i> *	B
1, 9, 17	pSAC 5 U 2	<i>cit</i> *	A
3, 11, 19	pSAC 5 U 2	<i>cit</i> *	B

酵母の内部性 2 μm プラスミドに寄宿する公認の創設酵素部屋 (Bartley と Roseman, 1960) 及び透析用プラスミド pSAC 5 及び pSAC 5 U 2 を用いて、プラスミド pSAC 5 に対するハイブリダイゼーションパターンを予想することが出来る。予想されるハイブリダイゼーションパターンを表 1 に示した。

説明書1-503275 (θ)

カコ内に示した数値は、分離したプラスミドが PLP による形質転換能を有する各菌株に亘るラジオノットを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果(第10回)とその予想(表1)とを比較すると、それぞれの形質転換能が示すように、同じ方向を有する PLP 菌株が位相内にあるハイブリダイゼーション DNA 配列の結果に相当する矢印をプラスミドが受けたことがわかる。第10回、pEAC302 とその由来された形質転換能の有る場合には、S 150-2 位相の内因性 2 バンドテニードはもはや存在していない。このことは、プラスミド pEAC302 で *clt⁺* が形質転換されることによって内因性 2 バンドテニードが無くなれたことを示している。

更に、プラスミド pEAC301 と pEAC310 が持つ形質転換能のハイブリダイゼーション DNA 配列の結果を分析したところ、*clt⁺* バンドを示す DNA (Vista と Missing, 1982) に相当する上記した DNA 配列のハイブリダイゼーションから明らかである。DNA *clt⁺* を質粒各株は、どの DNA プローブに対してハイブリダイゼーションしなかつた。

無形質転換能の株のゲラスミド pEAC300, pEAC310 及び pEAC1 の分析

DNA プローブとして pEAC300 及び pEAC310 を用いて、S 150-25 の *clt⁺* 及び *clt⁰* 菌株を形質転換し、得られた形質転換能の DNA 及び DNA 電気泳動を調べた。

プラスミド DNA	形質転換能アドミット	
	内因性	外因性
pEAC31	5.2 3.1 2.4 2.2	4.1 4.5 3.2 2.6
pEAC301 (4種類)	5.6 5.5 4.1 0.7	4.5 5.2 4.1 2.6
pEAC302 (4種類)	4.1 3.5 2.5 2.4	5.0 4.1 3.5 2.4

全ての株が内因性で、それらの株数が外因性でないことが確認された。即ち、pEAC300 及び pEAC310 は株数の形質転換能の内因性を示す菌株ハイブリダイゼーター DNA を除去することができる。その点に反して、プラスミド pEAC301 の結合能は、S 150-2 の *clt⁺* 形質転換能の DNA と質粒各株が有るに高い反面で失うことが確認された。このことについてはどのように説明すべきかは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即ち、pEAC300 は DNA が複数個が挿入されたことによつて *clt⁺* 因子が形成され、測定している PLP 連鎖子の発現が影響を受け、その結果 PLP レンジンピナーゼの発現が高くなつた可能性がある。

プラスミド pEAC300 は、複数型形質転換能、特に形質転換能の形質転換能に用いることを示した。即ち、Hinchliffe と Daubney (1986) に記載されている Bass ラーラー・ビール酵母 S 1 1.0 と pEAC301 で形質転換した。次いで、得られる細胞を形質転換能が保つていて、ターリックタマーベンゲートンマイドにより *clt⁺* 能能能が検定するか否かをチェックした。テストした形質転換能の約 1/8 が *clt⁺* 能能能を示し、このことは、发酵池酵母形質転換においてプラスミド pEAC301 の *in vivo* 分離が成功したことと示している。

プラスミド pEAC300, pEAC310 及び pEAC311 の *in vivo* 分離について、既往能が失われた形質転換能の分子上の特徴を行なうことによって分

析が進じていることを確認した。即ち、上記した *clt⁺* DNA が用いて新規 DNA をハイブリダイゼーションする所で、*clt⁺* 菌株が持つていては得らるる形質転換能が検出されなかつた。

“母株”形質転換能のプラスミド安定性

pEAC301, pEAC302, pEAC303 及び pEAC310 の分離された 4 タイプとも形質転換能を保持する S 150-2 の *clt⁺* 及び *clt⁰* 菌株における DNA 形質転換能の検定を、2 倍ペダルロードを含む YPD 中で選択的に培養を実行せしの、同じ東洋電機産業にプレートし、次いでカラシキを大きい大きさで加えプレートするなどによって調べた。1 世代当たりのプラスミドの増加率を計算し、表 2 に示した。

表 2

プラスミド濃度 (細胞あたりペクタム)	1 世代当たりのプラスミド濃度増加率(%)	
	<i>clt⁺</i> S 150-2B	<i>clt⁰</i> S 150-2B
pEAC301	0.22	0.19
pEAC302	0.31	0.14
pEAC303	2.5	-
pEAC310	0	0.89

特表平1-503275(10)

第2の結果から知るようだ、すべての分離された³ (テイミンテグリトキオキ) ベクターは、
S 1 5 0 - 2 8 の *cir* 及び *cir* 諸酵母中で不安定である。しかしながら、第 10 *cir* pBAC501, pBAC502 及び pBAC510 の不安定性のレベルは、S 1 5 0 - 2 8 中での他の *cir* 2 プロセス酵母ベクター (Cesalvo, et al., 1986) よりも少なくともランダムで低い。

pBAC5 の 2 プロセスミド部分のニューテ *Eco* I 領は第 10 *cir* 2 遺伝子を導入することによって、pBAC51, pBAC502 及び pBAC501 から分離される分離されたテクヌミド酵母体よりも遺伝子が低い割合されたテクヌミド酵母体が得られるなどと断言する。従つて、遺伝子マークの導入程度が、得られる遺伝子をテクヌミド酵母体の不安定性に対して大をなす効果を与えることが明らかである。この点に関して、2 プロセスミドのニューテ *SacB* 及び *Par* 1 領が既報で遺伝子導入によって遺伝子を失なすことが明らかである。秀歌子ら、どのような影響への導入によってテクヌミドの不安定性が発現を免れないからである。

酵母細胞型の「分離」酵母細胞でのテクヌミド酵母型

S 1 1 0 0 0 pBAC51 形酵母細胞の分離されたテクヌミド酵母体を有する分離酵母を操作について、病院微生物部の安藤祐祐が説明を述べた。上記したと同様にして得

テクヌミド安藤祐祐の実験を行なつたが、非選択的培養条件で 1 世代当たり 0.0 1 4 % のテクヌミド消失が観察された。この結果から、pBAC51 の分離されたテクヌミド酵母体は酵母細胞型 S 1 1 0 0 0 中で非常に安定であり、最初から S 1 1 0 0 0 遺伝子ベクターについてこれまで断言されたことのない程度の不安定性を有している。

総合中で目的とする遺伝子を安藤祐祐が掲げるためのテクヌミドテグレーシヨンベクターを創出することができる。

テクヌミド pBAC51 及び S 1 1 0 0 0 遺伝子及びユーテ *SacB* 1 領位を有しており、これらのがずれれた DNA 斷片を挿入しても、酵母でのテクヌミドの分離酵母体の供試菌の不安定性に対して早い影響を与えることなく、DNA 断片を失なすことができる。これらの条件は、目的とする遺伝子、例えば S. cerevisiae の *DX5-1* 遺伝子及びウサギガムマーテーで発現されるヒト骨アルブミン遺伝子の導入のための遺伝子供として用いることができる。企画の方法を用いて、遺伝子を常に多様な遺伝子マークとともにこのような遺伝子をどのようなユーテクヌミド酵母細胞に導入することができる。あるいは、テクヌミド pBAC51, pBAC502, pBAC510 及び pBAC501 は、目的とする遺伝子を挿入するための欠陥体として用いることができる。この点に関しては、テクヌミド pBAC501, pBAC502 及び pBAC510 は、UR45 遺伝子の S. cerevisiae 遺伝子 S 1 1 0 0 0 遺伝子を有し

ている (Boggs et al., 1984)。との *SacB* 1 領位を、導出する目的とする遺伝子を導入するための遺伝子型として用いることができる。

目的とする遺伝子を直接的にあるいは間接的に挿入するためには (例えば UR45 遺伝子を挿入し、次いでその *SacB* 1 領位に目的とする遺伝子を導入するような組合) *SacB* 1 領位を用いることが望ましいが苦渋は、ベクターの分離が従つている。即ち、ベクタリナ DNA 配列の部分がはつてたり、このことが失敗の原因の 1 つの原因を形成している。一方で、挿入された遺伝子から得られる 2 プロセス、特に酵母の状況オリジン (ori) から離れた *SacB* 1 領位の S 1 1 0 0 0 遺伝子が活性化されるのを止めするのが望まれている。従つて、挿入される形態は、(a) 目的とする遺伝子、(b) もの *ori* が付加された形で上にみるグルマーテー及び (c) 目的とする遺伝子の下部であつて且つ目的とする遺伝子と *ori* 間隔との間にある S-テクヌマークマークからなるのが好ましい。

引用文献

Angle et al., (1984), *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62, 1.

Andrews et al., (1985) *Cell*, 40, 795.

Boggs, (1978), *Nature*, 275, 104.

Boggs, (1981), In: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Bentzen Symposium No. 16, Munkegaard, Copenhagen.

Birnboim & Doly, (1980), *Nucleic Acids Research*, 2, 1513.

Bokov, (1979), *Genet. A.* 121.

Bottstein & Davis, (1982), In: "The Molecular Biology of the Yeast: *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression", Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Breath & Hicks, (1980), *Cell*, 21, 501.

Casadeben & Cohen, (1980), *Journal of Molecular Biology*, 155, 179.

Cashmore, et al., (1986), *Molecular and General Genetics*, 203, 154.

Chevallier & Angle, (1979), *FEBS Letters*, 105, 179.

Chevallier, et al., (1980), *Genet. 11-12.*

Clarke & Corcos, (1980), *Nature*, 287, 504.

Clark-Walker & Miklos, (1974). European Journal of Biochemistry, 41, 559.

Cohen et al., (1980). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1076.

Falco & Dames, (1985). Genetics, 102, 21.

Fischer, (1986). Journal of Theoretical Biology, 119, 197.

Fischer & Cox, (1985). Journal of Bacteriology, 154, 612.

Garbaud et al., (1979). Gene, 5, 235.

Gritz et al., (1983). Gene, 25, 128.

Granstein & Nagy, (1975). Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 3961.

Guerineau, et al., (1974). Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.

Hadjidis, et al., (1986). Gene, 40, 149.

Harford & Gettys, (1985). DNA, 4, 80.

Harford & Peters, (1987). Current Genetics, 11, 315.

Hwang, et al., (1985). Biootechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 577.

Livingston, (1977). Genetics, 86, 73.

Livingston & Habne, (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.

Mandaric et al., (1982). In: "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.

Murray et al., (1987). The EMBO Journal, 6, 4205.

Nelson & Pangman, (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.

Newton, et al., (1981). UCN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 22, 501.

Orr-Weaver, et al., (1981). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6534.

Orr-Weaver, et al., (1985). In "Methods in Enzymology". Eds. Wu, et al., 201, 228. Academic Press, New York.

Rino, et al., (1985). Proceedings of the Bartley & Donelson, (1980). Nature, 286, 280.

Henderson et al., (1985). Current Genetics, 9, 115.

Bicks et al., (1979). Cold Spring Harbour Symposium Quantitative Biology, 43, 1805.

Hinchliffe & Box (1985). Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 20th, Wiesbaden, 267.

Hinchliffe & Danbury (1986). Journal of the American Society of Brewing Chemists, 44, 73.

Himma et al., (1978). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 1929.

Ito et al., (1985). Journal of Bacteriology, 155, 163.

Kytes, et al., (1982). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 1578.

Jayaram, et al., (1985). Cell, 40, 95.

Jiminez et al., (1980). Nature, 287, 869.

Kikuchi, (1985). C+L, 55, 487.

National Academy of Sciences, USA, 80, 6750.

Rose et al., (1984). Gene, 29, 183.

Neftestein, (1985). In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 202. Academic Press, New York.

Selley et al., (1980). Nucleic Acids Research, 8, 3371.

Sigurdson et al., (1981). Molecular and General Genetics, 183, 59.

Som et al., (1986). Cell, 42, 27.

Storms, et al., (1979). Journal of Bacteriology, 140, 75.

Suzuki et al., (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1055.

Takemoto et al., (1980). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 5144.

Tubb, (1980). Journal of the Institute of Brewing, 86, 78.

Vierra & Messing, (1982). Gene, 19, 259.

Volpert & Broach, (1986), *Cell*, **44**, 541.

Volpert & Broach, (1987), *In Press*.

Walnsley, et al., (1985), *Molecular and General Genetics*, **192**, 561.

Webster & Dickson, (1983), *Gen*, **26**, 245.

Winston, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Ed. W.C. et al., **101**, 211.

Wu, et al., (1985), In "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology: Yeast Cell Biology", Ed. Hicks, 223.

Yocom, (1985), 京都市府山町6 163491.

酵母人形においては、同じ方向を向く 2 つの MLP が共存経路のみと、大差ない方向をそれらの間にあらべタケチロ DNA (向人) は酵母人形のマークによって分離された DNA (その 2 つの部分の長い配列として) とを示すアラスイドを発現してもよい。酵母人形は、このようなアラスイドは 1 つの酵母人形を有し、かつて通常の 2 つの酵母人形をもつ、A 酸と B 酸の組合型とならない。このようなアラスイドは上記したアラスイドよりも不安定であるが、不完全の 1 本鎖を形成しそのものもアラスイドとなる。

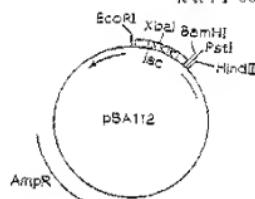


Fig. 1

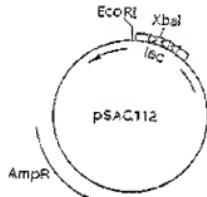


Fig. 2

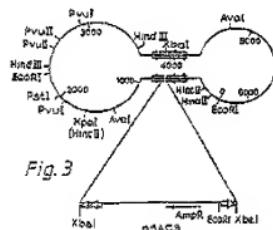


Fig. 3

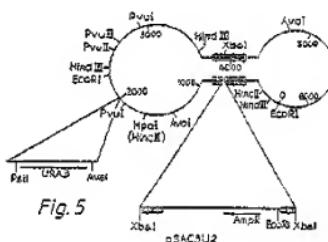


Fig. 5

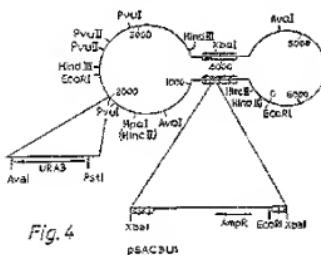


Fig. 4

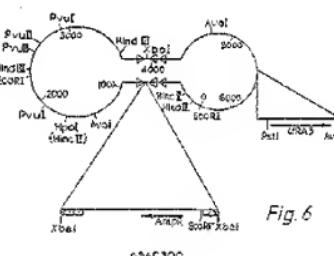
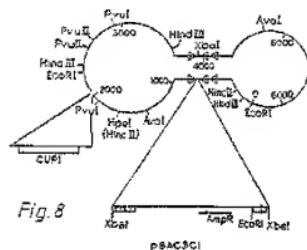
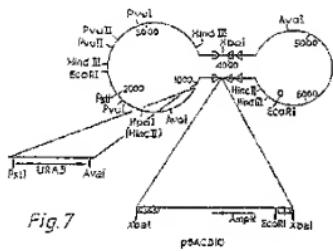
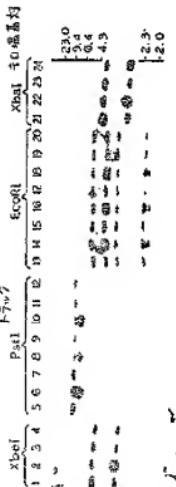
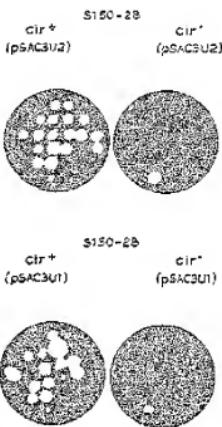


Fig. 6

Fig. 9 URA3-R₁Uba1⁺の増殖の結果

Asset location: major location/report	Initial Date rec'd	Initial Date transferred	Initial Date transferred	Initial Date transferred
27-A- 0281229	32-11-26	12-11-44	21/11/29	9-11-24-08
		23-11-44	03/12/2000	
		24-11-44	04/11/2003	03-11-03

Asset location: major location/report	Initial Date rec'd	Initial Date transferred	Initial Date transferred	Initial Date transferred
W0-A- 0281226	23-05-07	12-11-44	01/11/29	04-04-03
		23-11-44	03/12/2000	03-11-03
		24-11-44	04/11/2003	

Asset location: major location/report	Initial Date rec'd	Initial Date transferred	Initial Date transferred	Initial Date transferred
EP-A- 0147193	05-07-65	10-11-44	17/01/84	10-12-93

Journal of the American Water Resources Association, Vol. 35, No. 4, pp. 1111-1124, 1999
© 1999 American Water Resources Association

第1回の書き

原书馆主張 1987年8月3日イギリス(GB)08718347

④発明者 チェリイ, シモン アンドリュ イギリス国 エヌジー-13 8イーティー, ノツテインガムシャー,
一 ピンガム, マスターズ ロード, 4